

# Inizio della replicazione negli eucarioti

**E.coli**: la proteina iniziatore (Dna A) si lega alle 4 sequenze di 9 bp. Dopo aver legato ATP, riesce ad interagire anche con la regioni di 13 bp, denaturando ~20 bp, poi recluta le altre proteine di inizio.

**Eucarioti**: l'iniziatore è una proteina esamerica (ORC, origin recognition complex), ben studiata solo nel lievito. Anche ORC lega ATP, ma a differenza di DnaA, per separare i filamenti deve prima reclutare tutte le proteine di inizio.

*“It is clear that chromosome reproduction in higher organisms is a very elaborate process requiring multiple control mechanisms which have to be coordinated. The analysis of these mechanisms as well as the exact role of the structural elements involved may turn out to be very difficult.” Jacob, 1963*

The limited number of identified origins prevented a comprehensive and exhaustive search for conserved genomic features that were capable of specifying origins of DNA replication. More recently, the adaptation of origin-mapping assays to genome-wide approaches has led to the identification of tens of thousands of replication origins throughout mammalian genomes, providing an unprecedented opportunity to identify both genetic and epigenetic features that define and regulate their distribution and utilization. 2016

### Genomic and epigenetic features associated with mammalian origin activity

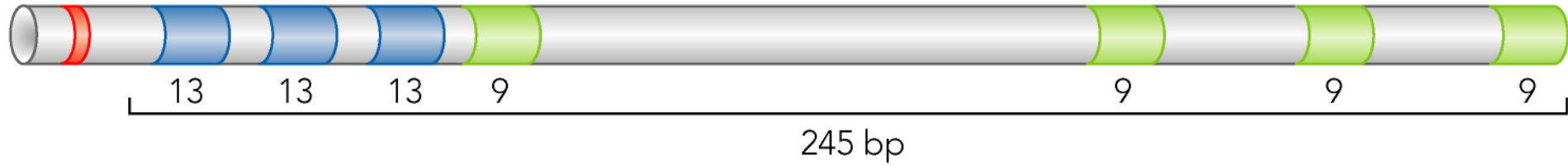
**Table 1.** Genomic and epigenetic features associated with mammalian origin activity

Feature	Factor	Evidence
G4 quadruplex	Primary sequence	Enriched in the vicinity of replication origins [Besnard et al. 2012; Cayrou et al. 2012]; may position nucleosomes, interact with replication factors; necessary but not sufficient for origin function [Valton et al. 2014]
NFR (nucleosome-free region)	Primary sequence and ATP-dependent chromatin remodelers	Decreased nucleosome density at origins of replication and ORC-binding sites [Lubelsky et al. 2011; Lombraña et al. 2013; Cayrou et al. 2015]
H4K20 methylation	PR-Set7, Suv4-20h1/2	The ORC1-BAH (bromo-adjacent homology) domain interacts with H4K20me2 [Kuo et al. 2012]; dysregulation of PR-Set7 impacts DNA replication and genomic stability [Tardat et al. 2010]
H3K79me2 H4K5ac, H4K8ac, H4K12A	DOT1L HBO1	Enriched at origins and limits reinitiation [Fu et al. 2013] Interacts with ORC1 [Iizuka and Stillman 1999] and promotes pre-RC assembly [Miotto and Struhl 2008, 2010] and origin activation [Feng et al. 2016]
H3K4me3	KDM5C/JARID1C	Enriched at replication origins [Picard et al. 2014; Cayrou et al. 2015]; demethylation promotes origin activation [Rondinelli et al. 2015]
H3ac/H4ac	Various histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases [HDACS]	Enriched at replication origins [Cadoret et al. 2008; Sequeira-Mendes et al. 2009]; hyperacetylation promotes origin activity and advances replication timing [Goren et al. 2008]; binding of USF near an origin advances replication timing [Hassan-Zadeh et al. 2012], likely due to recruitment of PCAF, CBP, and p300 [West et al. 2004]
H3K27me3	Polycomb-repressive chromatin	Enriched at replication origins [Picard et al. 2014; Cayrou et al. 2015]

Il replicatore include siti di legame (sequenze di DNA) per l'inziatore, e siti (sequenze di DNA) facilmente denaturabili

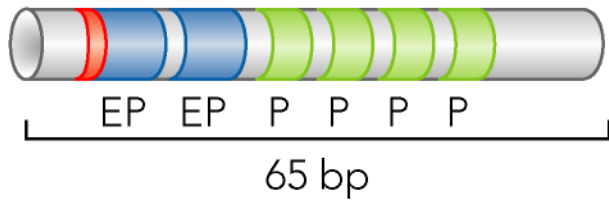
**a**

*oriC (E. coli)*



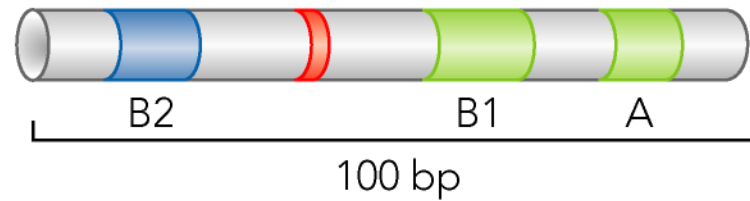
**b**

SV40



**c**

*S. cerevisiae*



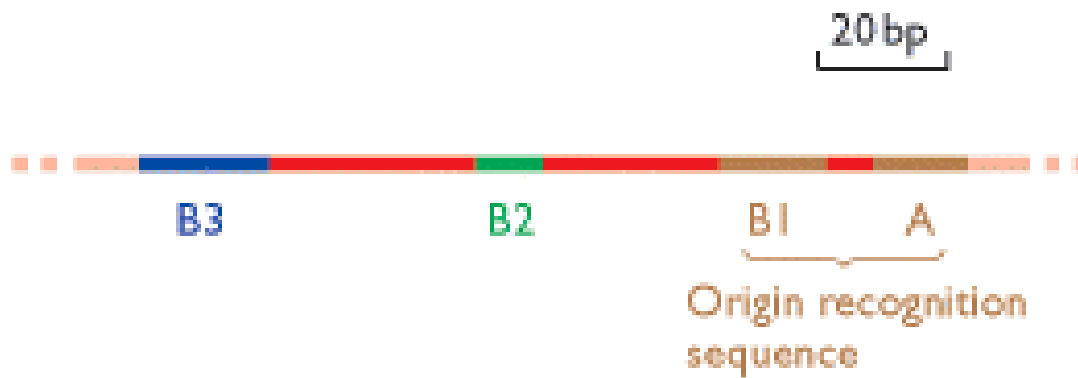
Caratteristiche queste comuni a tutti i replicatori dei vari organismi

- **Each eukaryotic chromosome is one linear DNA double helix**
- **Average  $\sim 10^8$  base pairs long**
- **With a replication rate of 2 kb/minute, replicating one human chromosome would require  $\sim 35$  days.**
- **Solution ---> DNA replication initiates at many different sites simultaneously.**

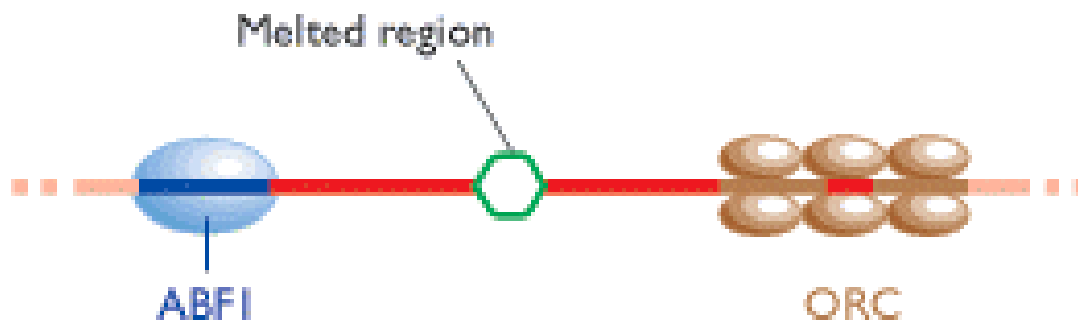
# ORIGINE DELLA REPLICAZIONE DI LIEVITO (*S. CEREVISIAE*).

## ARS1

(A) Structure of a yeast origin of replication



(B) Melting of the helix



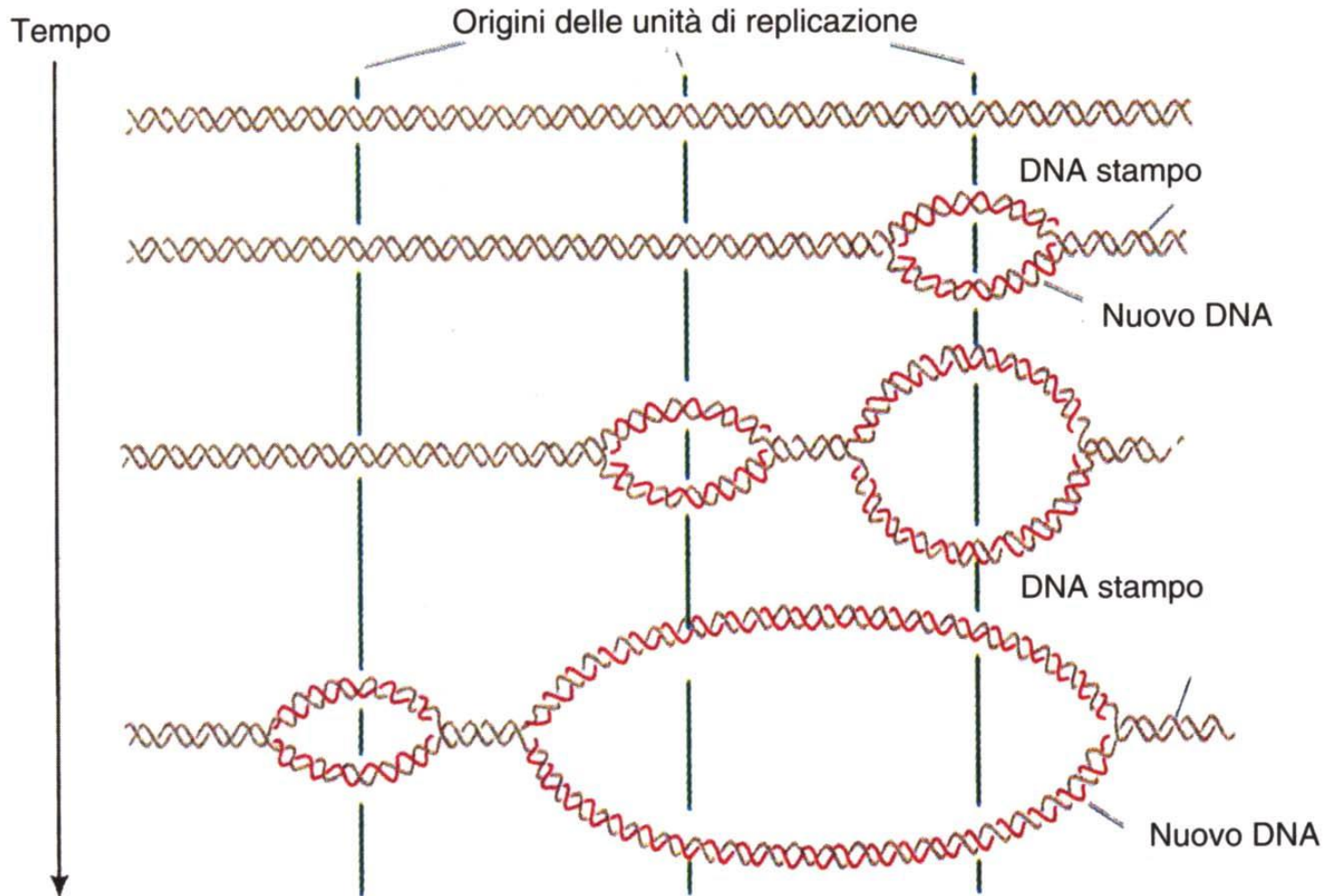
Il melting (denaturazione) della doppia elica avviene nel sub-dominio B2, ed è indotto dall'attacco di ABF1 (ARS binding protein 1) al sub-dominio B3.

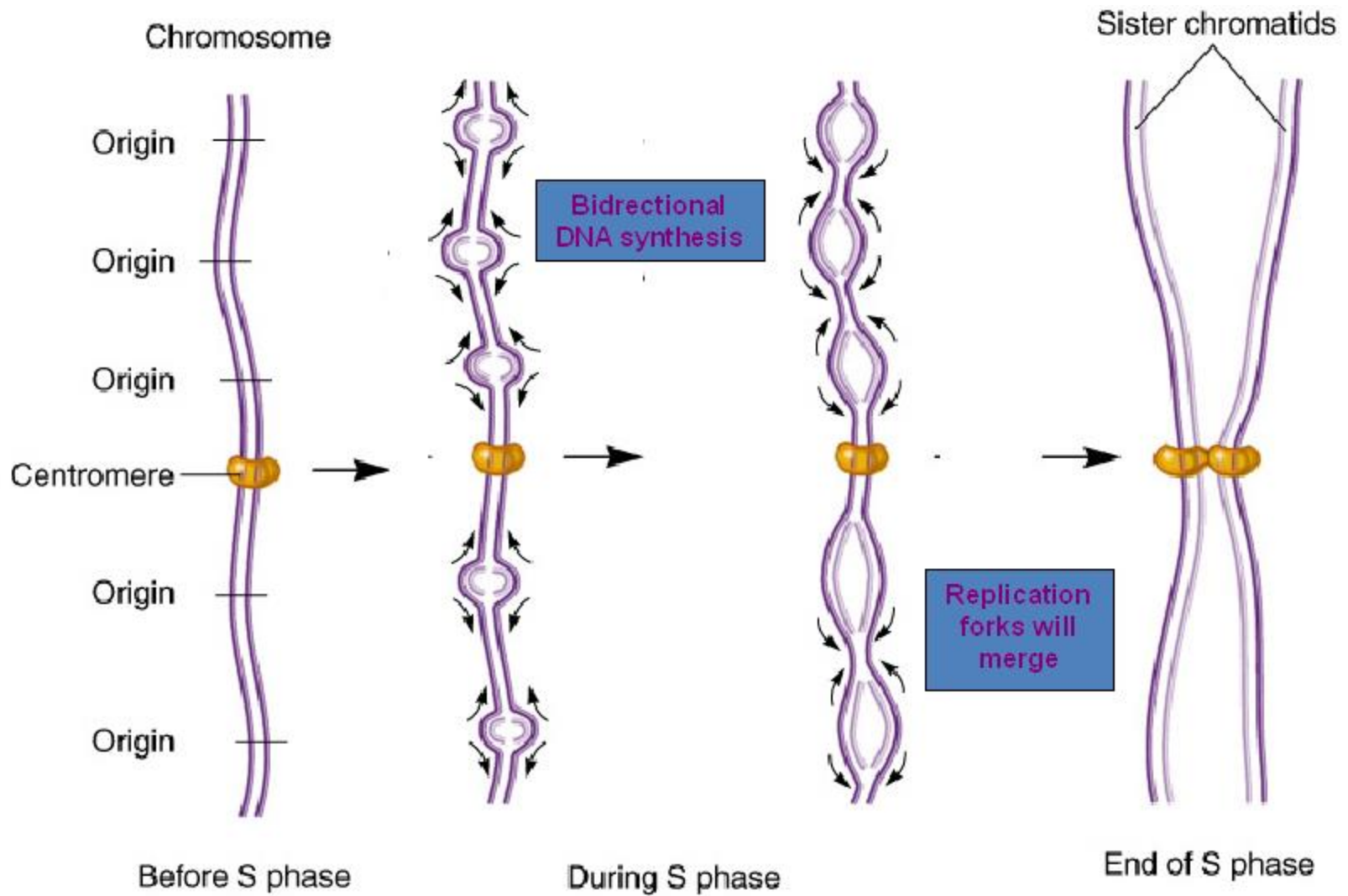
Le proteine del complesso di origine della replicazione (ORC) sono permanentemente attaccate ai sub-domini A e B1.

# **Le origini di replicazione in tutti gli organismi in cui siano state identificate mostrano proprietà simili**

- Le origini sono segmenti di DNA che contengono brevi sequenze ripetute multiple**
- Queste sequenze vengono riconosciute e legate da proteine multimeriche specifiche, che giocano un ruolo chiave nell'attivazione dell'origine e nel successivo assemblaggio della DNA polimerasi**
- Le regioni dell'origine contengono sequenze ricche in AT (appaiamenti che facilitano la denaturazione dell'elica)**

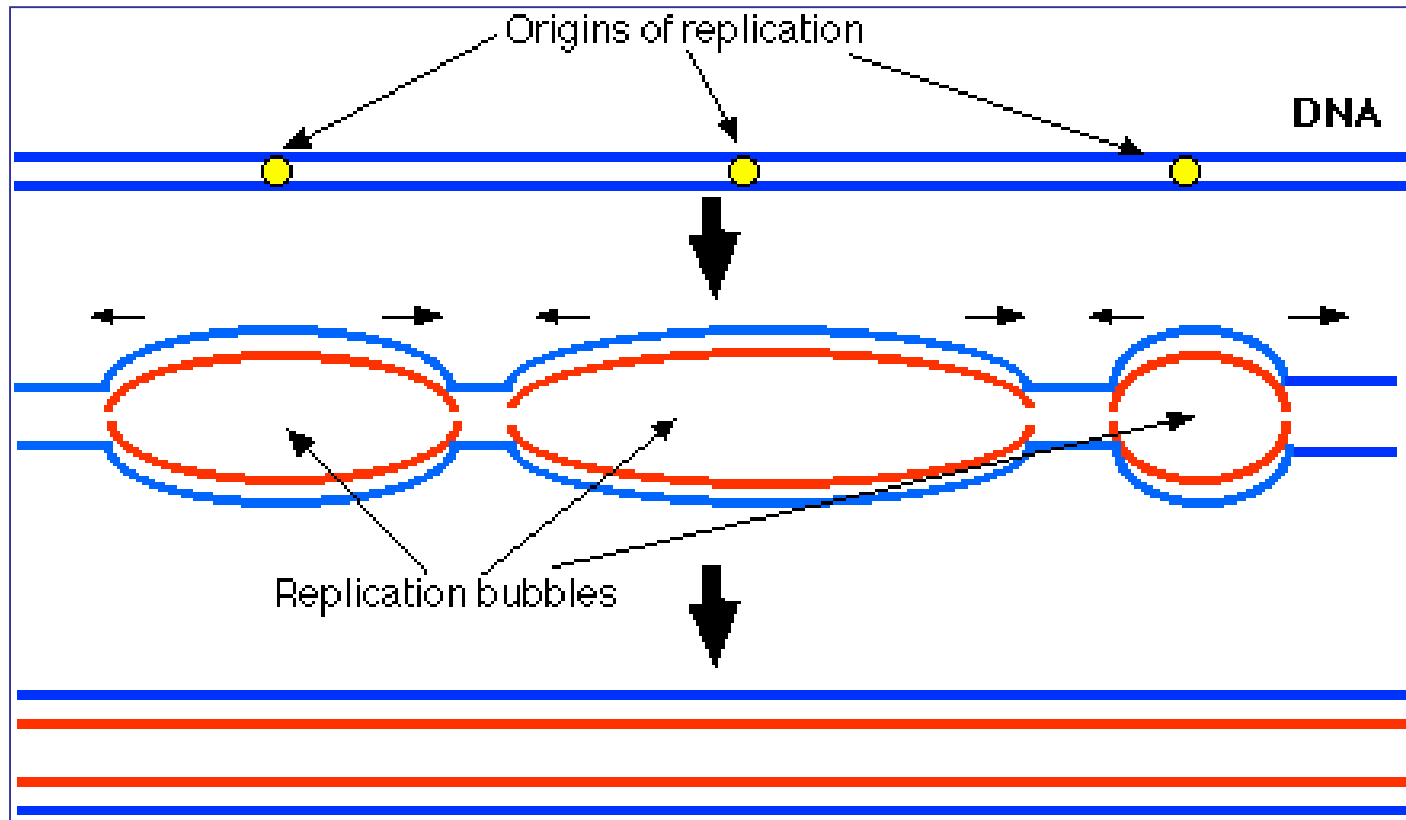
# ORI Eucarioti (ARS sequences nel lievito): asincrona e repliconi diversi







## ORIGINI DI REPLICAZIONE (Eucarioti multicellulari)



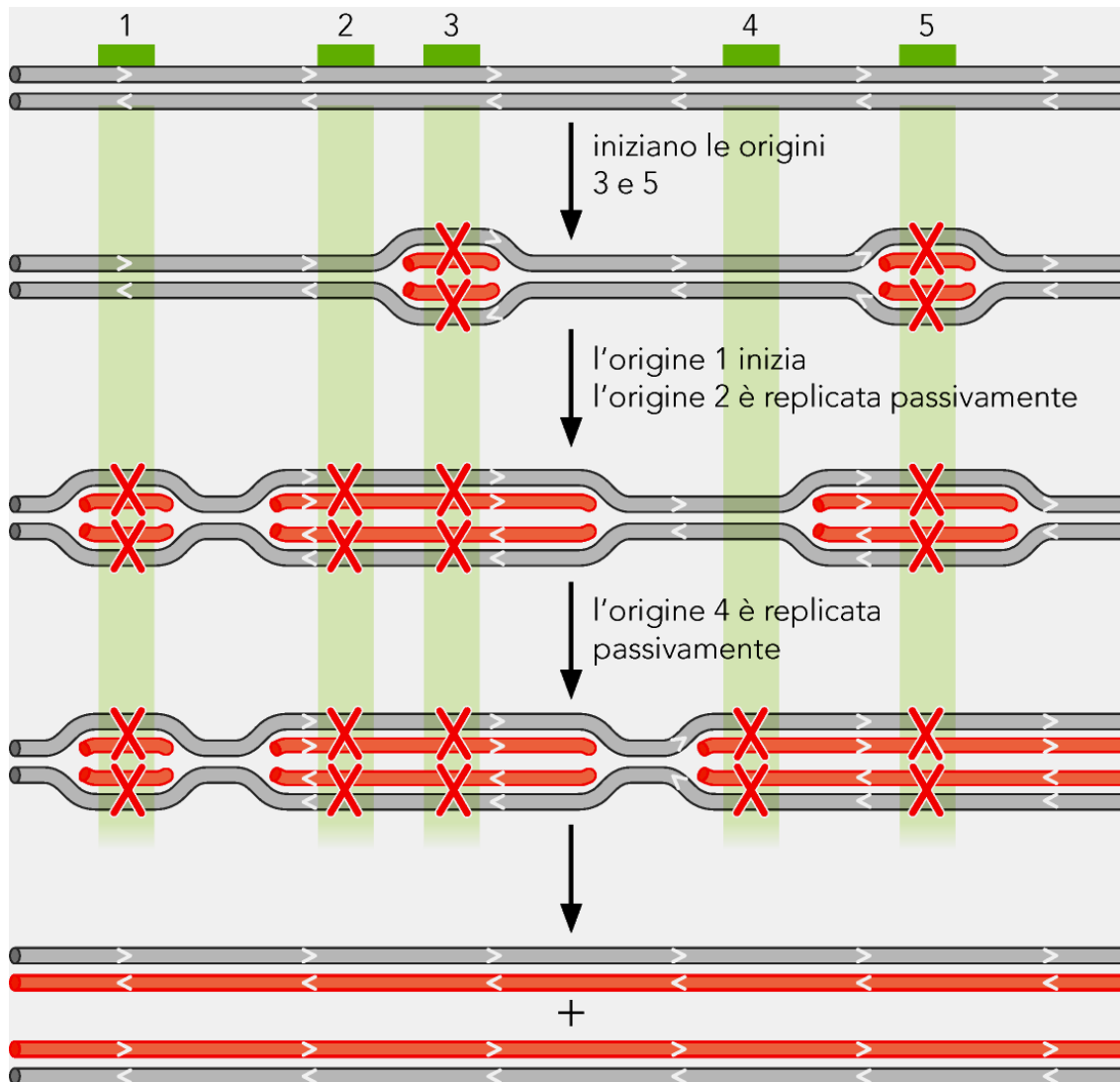
**Negli eucarioti multicellulari esistono da 20.000 a 50.000 origini di replicazione (ne sono state mappate circa una ventina)**

**Sono tutte localizzate in siti specifici , hanno lunghezza variabile e non mostrano sequenze consensus.**

**Le origini potrebbero essere definite da diverse combinazioni di elementi di sequenza.**

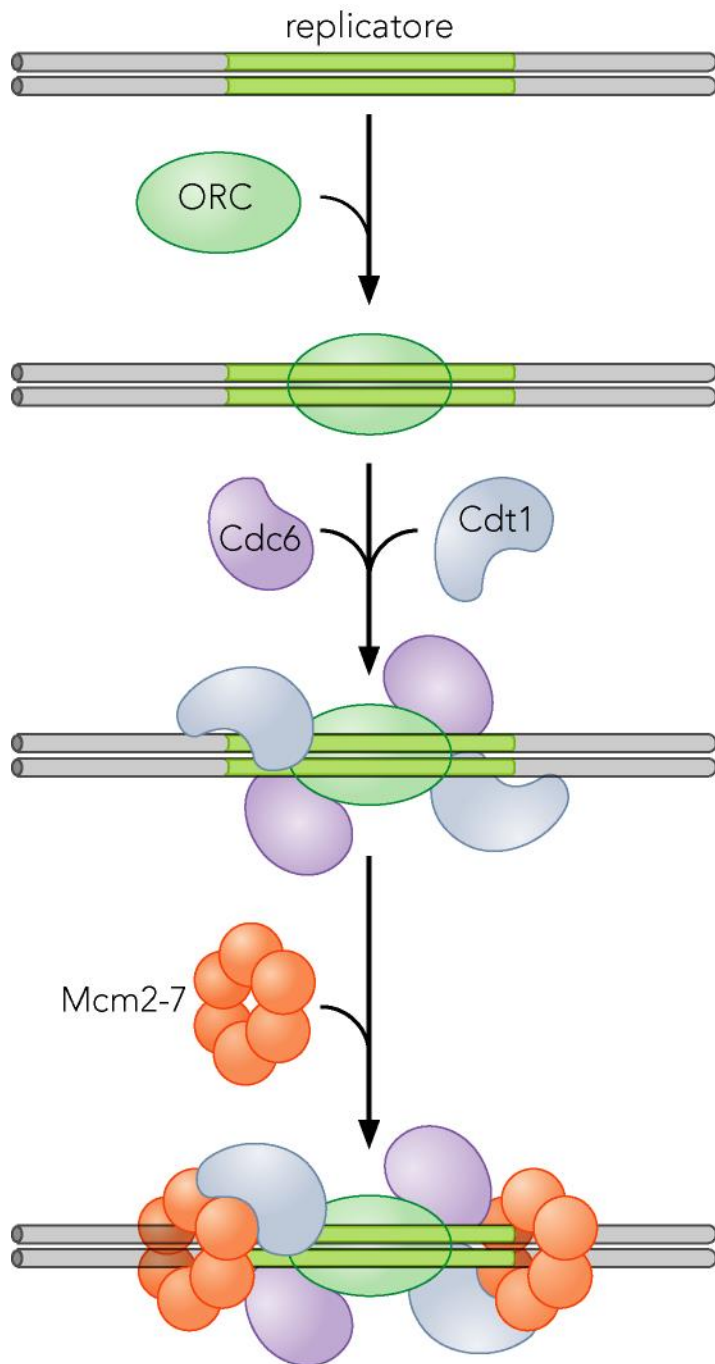
**Non è detto che ci sia una singola combinazione consensus che definisce un'origine.**

# Negli eucarioti non tutte le origini vengono attivate contemporaneamente



Una volta attivate le origini non possono ulteriormente essere attivate (contengono DNA neosintetizzato)

Alcune origini sono replicate passivamente (per estensione della/e bolla/e adiacenti); e non verranno quindi attivate poiché "contengono" DNA neosintetizzato

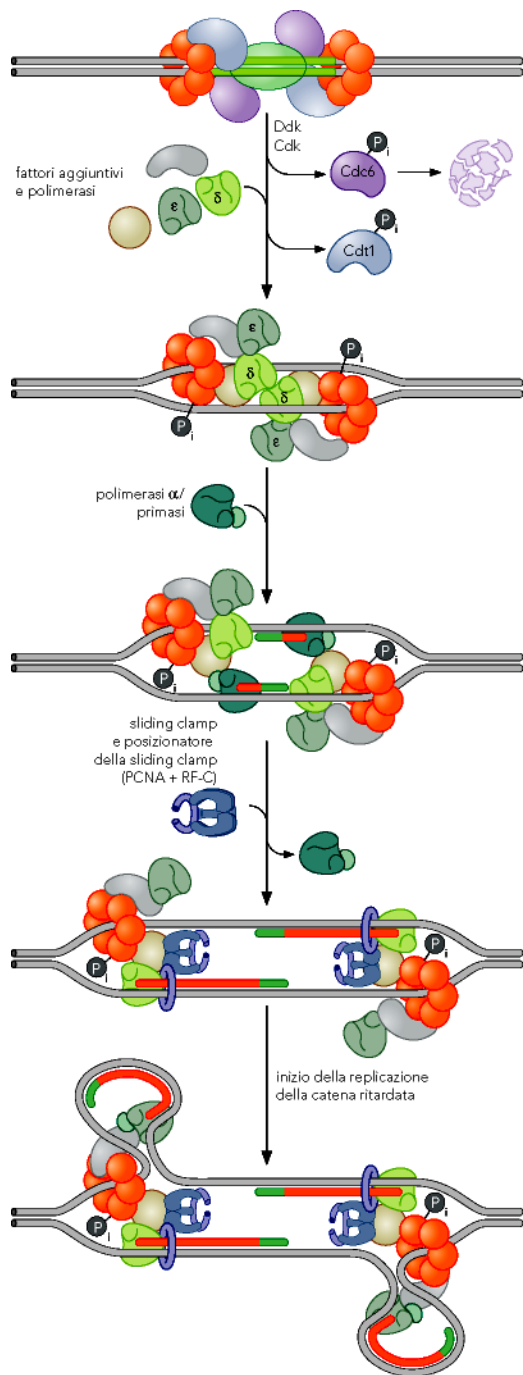


**Perché la replicazione inizi, ciascuna origine deve essere legata da un complesso di pre-replicazione (preRC):**

- **il complesso ORC ( Origin Recognition Complex), il cui ruolo principale è quello di reclutare ulteriori componenti del complesso di selezione/attivazione**

- **proteine accessorie chiamate “licensing factors”(Cdc6 e Cdt1), che si accumulano nel nucleo durante la fase G1, si legano a ORC e sono essenziali per il reclutamento delle MCM (sono i caricatori delle elicasi)**

- **le proteine MCM (elicasi)**



L'attivazione del pre-RC porta all'assemblaggio della forza replicativa degli eucarioti:

Una volta attivato il pre-RC vengono rilasciati e degradati i caricatori delle elicasi (Cdc6 e Cdt1).

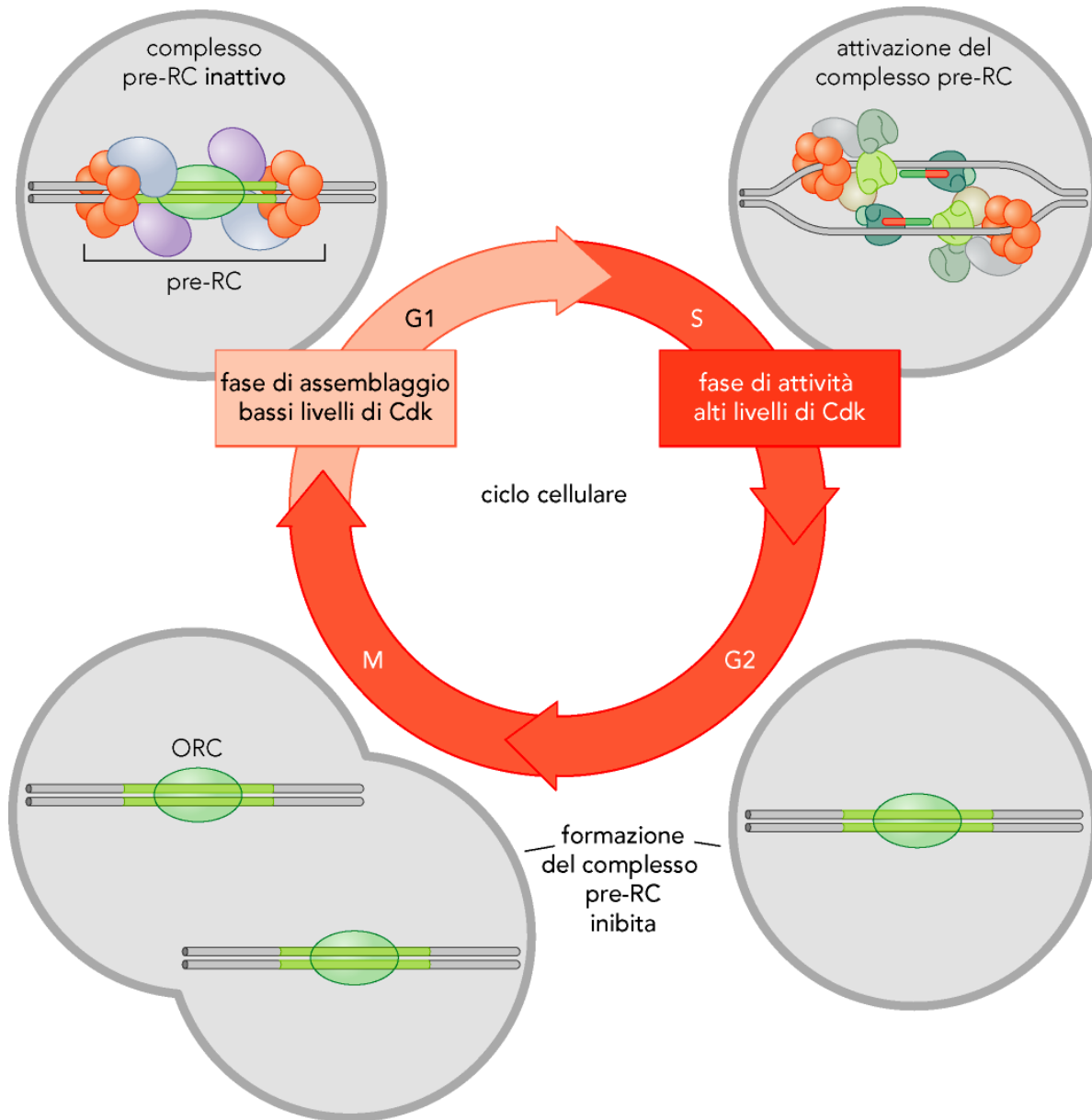
Vengono reclutate le polimerasi delta ed epsilon su entrambi le forche

Viene quindi reclutata la polimerasi alfa (la primasi) su entrambi i filamenti anticipati

Ed infine su entrambi i filamenti la viene reclutata la pinza beta (PCNA) insieme con il caricatore della pinza (RF-C)

Parte la sintesi dei filamenti anticipati  
Ed in seguito quella dei filamenti ritardato che coinvolge ancora il caricatore di (una nuova) pinza beta

# Il complesso di pre-replicazione è assemblato in fase G1, ma attivato in S

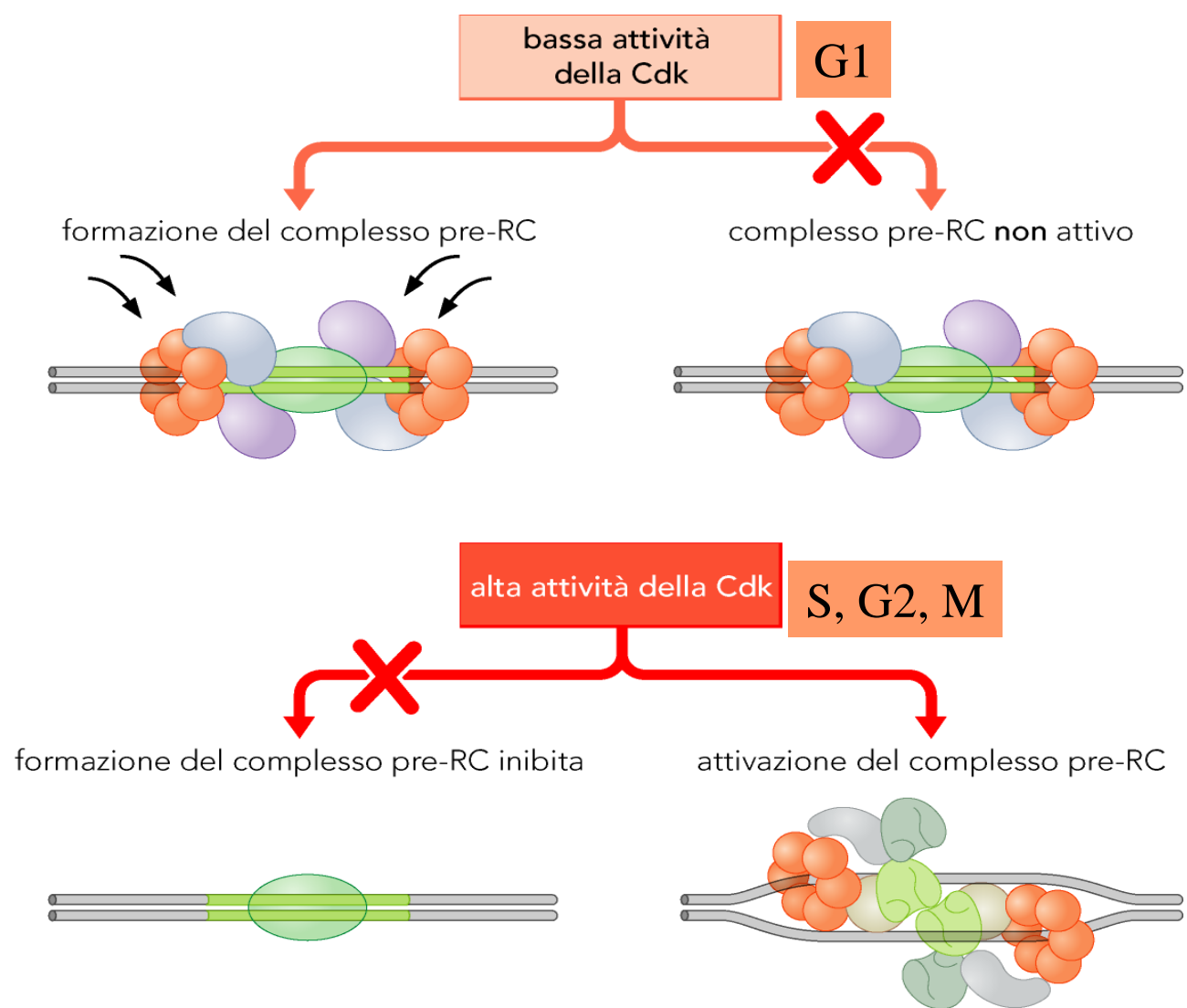


In condizioni normali (in cellule non trasformate), avviene una sola volta per ciclo cellulare ed in fasi ben precise dello stesso: viene assemblato in G1, ed attivato in S.

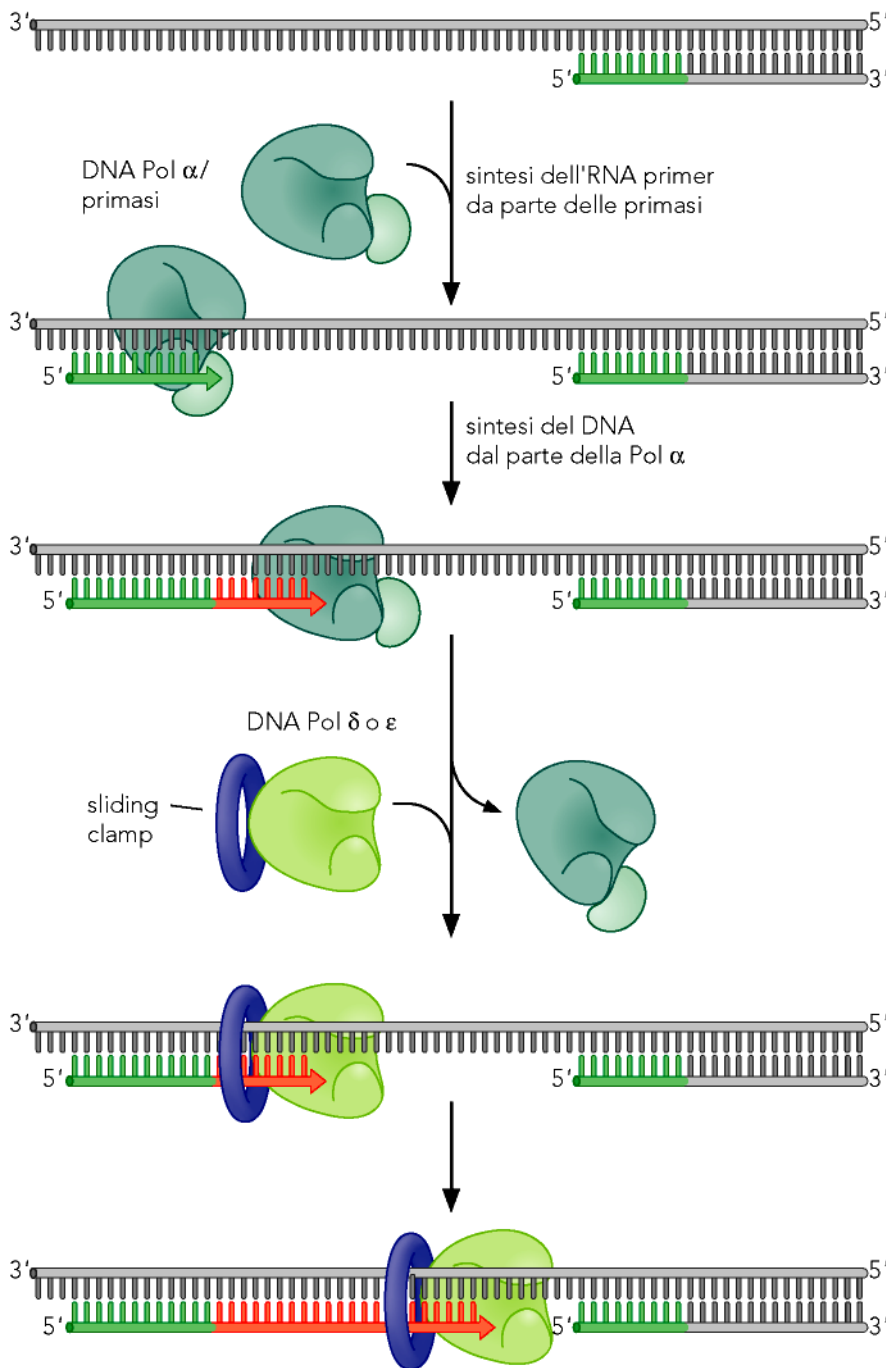
Per questo motivo controlla anche il numero delle copie di genoma replicate

# Ruolo di CDK

CDK  
impedisce la  
formazione di  
nuovi com-  
plessi pre-RC e  
attiva i com-  
plessi pre-RC  
già assemblati



Quindi controlla il numero di replicazioni/ciclo Tale controllo dipende anche dalla possibilità -per le proteine che devono formare il complesso di pre-replicazione- di avere libero accesso al replicatore, e ciò è facilitato dall'assenza dell'involucro nucleare che dipende dall'attività CDK

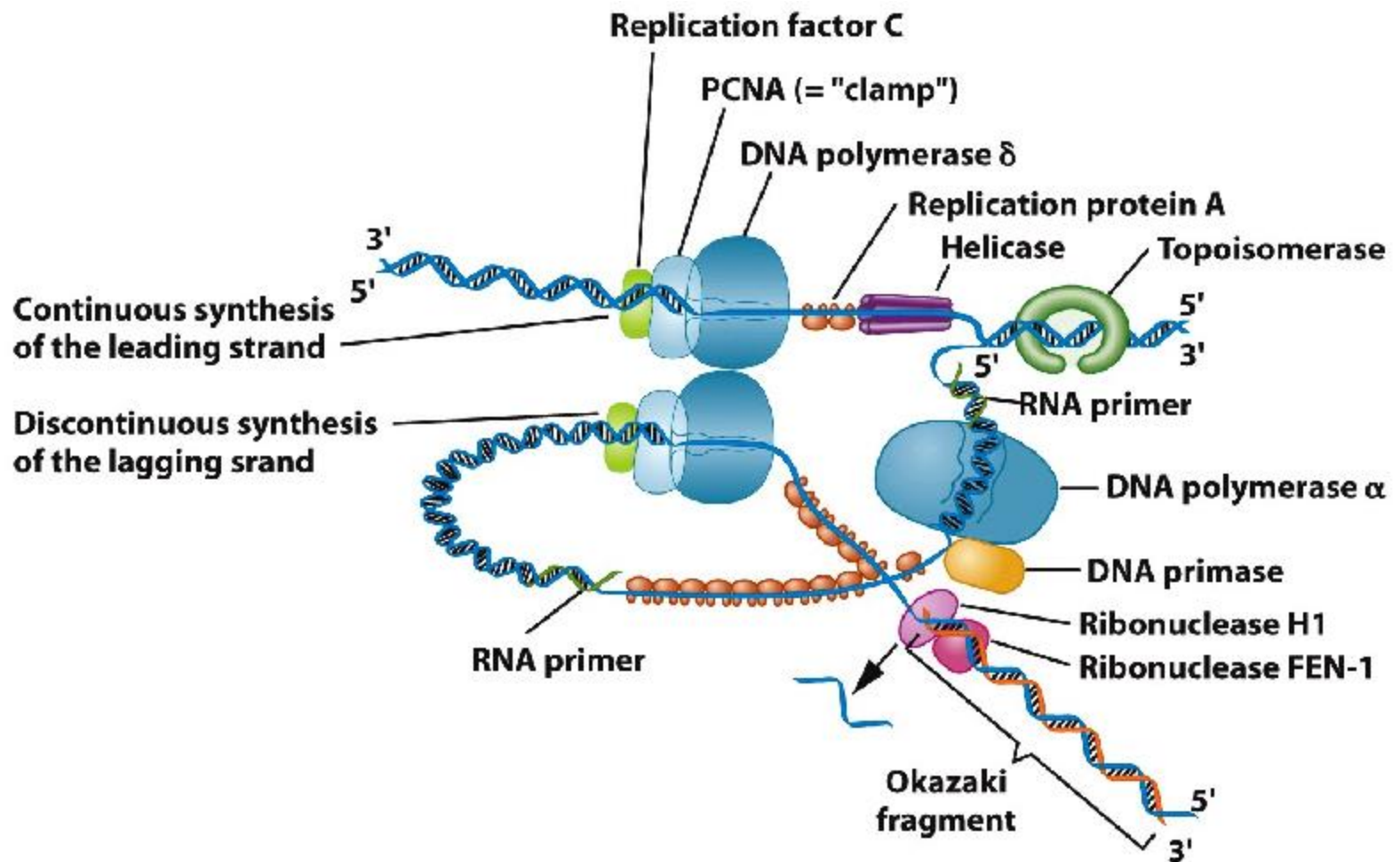


Negli eucarioti non esiste un analogo della DNA polimerasi III, per cui al livello della forza vengono reclutate due diverse polimerasi.

Poiché le diverse polimerasi esistenti negli eucarioti (tre di queste sono essenziali) hanno caratteristiche diverse vengono diversamente e sequenzialmente implicate nella replicazione:

La polimerasi alfa ha attività primasica, bassa processività e manca di attività proof-reading (viene implicata soltanto nelle fasi iniziali)

Le polimerasi delta ed epsilon hanno alta processività (interagiscono con la PCNA = pinza beta) ed attività di proof-reading sono quindi coinvolte nella replicazione delle due eliche stampo





## TABLE 11.4

### Eukaryotic DNA Polymerases

Polymerase Types*	Function
$\alpha, \delta, \varepsilon$	Replication of nondamaged DNA in the cell nucleus during S phase
$\gamma$	Replication of mitochondrial DNA
(lesion-replicating polymerases)	Replication of damaged DNA
$\alpha, \beta, \delta, \varepsilon, \sigma, \lambda, \mu, \phi, \theta$	DNA repair or other functions <sup>†</sup>

## Le DNA polimerasi eucariotiche catalizzano la replicazione o la riparazione

DNA polimerasi	Funzione	Struttura
<b>Replicasi ad alta fedeltà</b>		
$\alpha$	Replicazione nucleare	Tetramero di 350 kD
$\delta$	"	Tetramero di 250 kD
$\epsilon$	"	Tetramero di 350 kD
$\gamma$	Replicazione mitocondriale	Dimero di 200 kD
<b>Riparazione ad alta fedeltà</b>		
$\beta$	Riparazione per escissione delle basi	Monomero di 39 kD
<b>Riparazione a bassa fedeltà</b>		
$\zeta$	Bypass dei dimeri di timina	Eteromero
$\eta$	Riparazione delle basi danneggiate	Monomero
$\iota$	Necessaria alla meiosi	Monomero
$\kappa$	Delezione e sostituzione di basi	Monomero

**Tabella 13.2** Le DNA polimerasi coinvolte nella replicazione dei genomi batterici ed eucariotici.

Enzima	Subunità	Attività esonucleasica		Funzione
		3'→5'	5'→3'	
<b>DNA polimerasi batteriche</b>				
DNA polimerasi I	1	Sì	Sì	Riparazione del DNA, replicazione
DNA polimerasi III	Almeno 10	Sì	No	Principale enzima della replicazione
<b>DNA polimerasi eucariotiche</b>				
DNA polimerasi $\alpha$	4	No	No	Innescare la replicazione
DNA polimerasi $\gamma$	2	Sì	No	Replicazione del DNA mitocondriale
DNA polimerasi $\delta$	2 o 3	Sì	No	Principale enzima della replicazione
DNA polimerasi $\epsilon$	Almeno 1	Sì	No	Richiesto per l'individuazione dei danni al DNA durante la replicazione del genoma (Sezione 13.3.2)
DNA polimerasi $\kappa$	1 o 2?	?	?	Richiesto per l'attacco delle molecole di coesina che tengono uniti i cromatidi fratelli fino allo stadio di anafase della divisione nucleare (Sezione 13.2.3)

I batteri e gli eucarioti possiedono altre DNA polimerasi coinvolte principalmente nella riparazione del DNA danneggiato. Questi enzimi includono le DNA polimerasi II, IV e V di *Escherichia coli* e le DNA polimerasi  $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  e  $\iota$  eucariotiche. I processi di riparazione sono descritti nella Sezione 14.2.

## Two different pathways proposed for RNA primer removal:

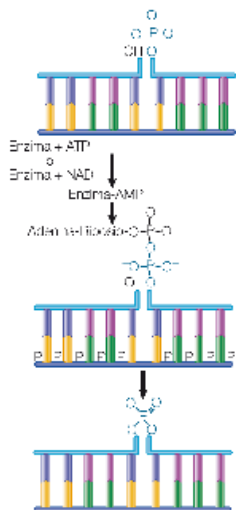
1. Ribonuclease H1 nicks the RNA primer and the primer is degraded by FEN-1 (flap endonuclease 1)
2. DNA pol  $\delta$  causes strand displacement and FEN-1 removes the entire RNA containing 5' "flap."



## La rimozione dei primers negli eucarioti

- 1) la sintesi di un frammento di Okazaki scalza il primer del frammento precedente, che forma una coda (*flap*).
- 2) La base del *flap* viene tagliata dall'enzima **FEN1**: l'enzima in tale reazione funziona come endonucleasi, ma possiede anche attività 5'-3' esonucleasica.

I frammenti di Okazaki adiacenti sono quindi **uniti tra loro**: l'estremità 3'-OH di un frammento si trova adiacente all'estremità 5'-fosfato del frammento che lo precede.

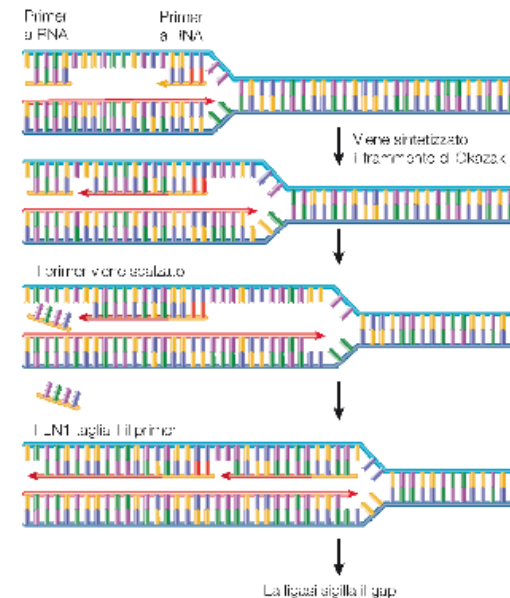


Le due estremità sono saldate dalla **DNA ligasi**, che forma un legame grazie ad un complesso con l'AMP:

l'AMP è attaccato al 5'-fosfato e poi viene formato un legame fosfodiesterico con l'estremità 3'-OH, con enzima e AMP che sono rilasciati.

Le ligasi sono presenti sia negli eucarioti che nei procarioti

Le ligasi di *E. coli* e fago T4 compiono appunto la reazione in due stadi, creando un complesso enzima-AMP, ma utilizzano cofattori diversi.

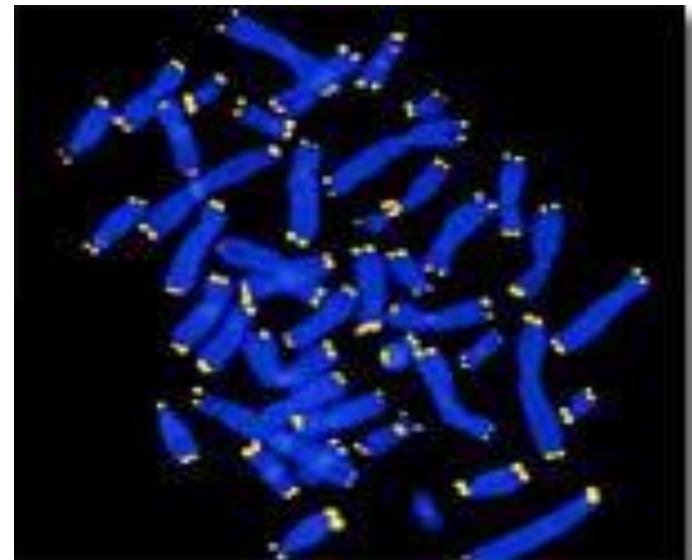
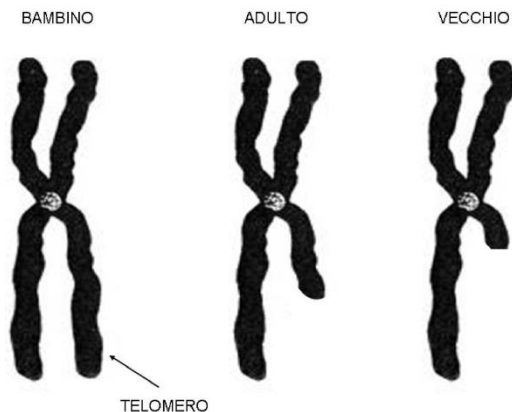


## Enzimi e fattori che intervengono nella replicazione del DNA

<b>Funzione</b>	<i>E. coli</i>	<b>Uomo</b>
<b>Elicasi</b>	DnaB	Mcm2-7
<b>Elicasi di caricamento/primasi</b>	DnaC	Mcm2-7
<b>Mantenimento del singolo filamento</b>	SSB	RPA
<b>Innesco</b>	DnaG (primasi)	Pol $\alpha$ /primasi
<b>Pinza scorrevole</b>	$\beta$	PCNA
<b>Caricamento della pinza (ATPasi)</b>	Complesso $\gamma\delta$	RFC
<b>Allungamento del filamento</b>	Pol III	Pol $\delta$ /Pol $\epsilon$
<b>Rimozione dell'RNA primer</b>	Pol I	FEN-1, Rnasi H1
<b>Legatura dei frammenti di Okazaki</b>	Ligasi	Ligasi 1

# Telomeri

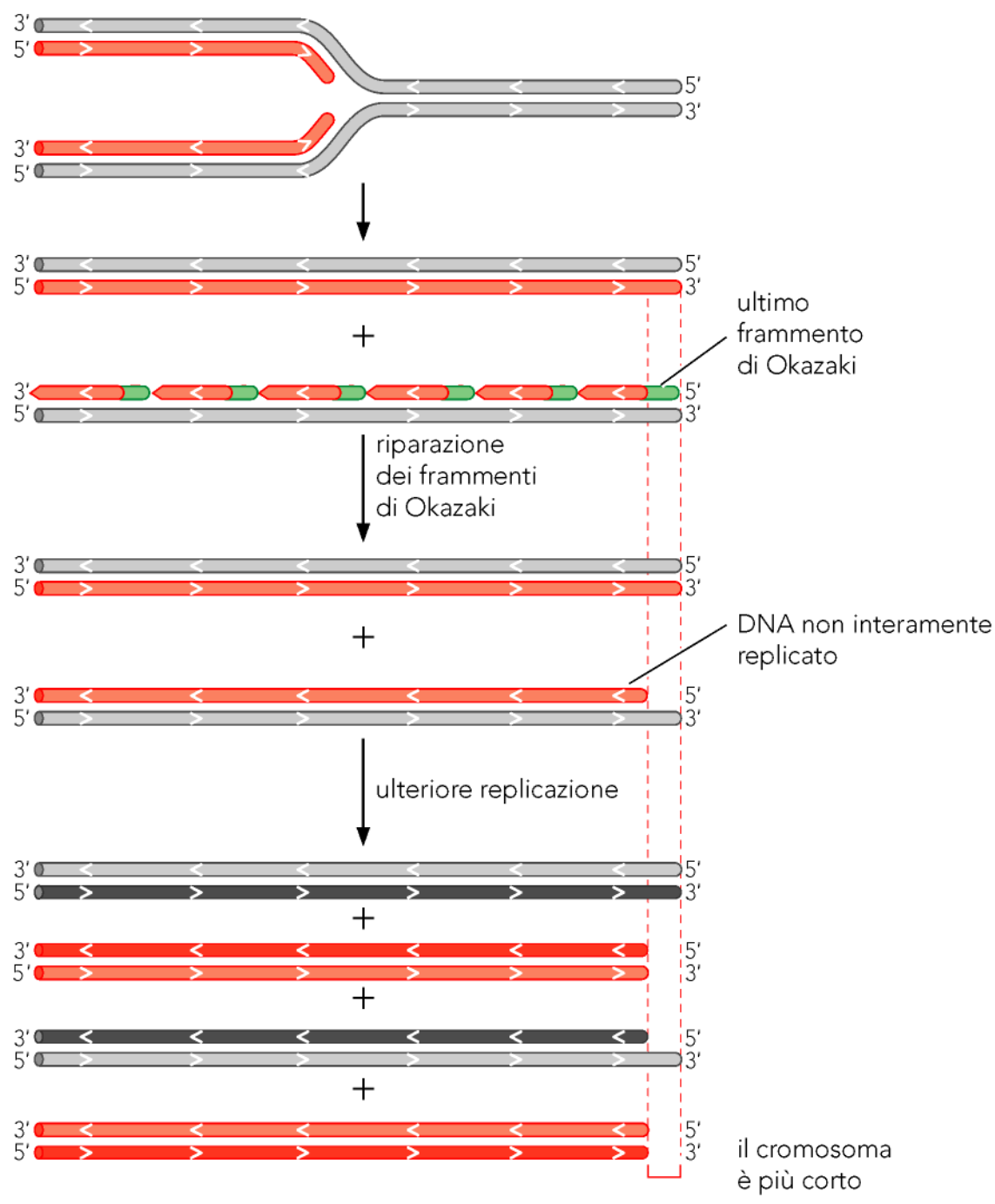
- Il **telomero** è la regione terminale del cromosoma, da cui deriva il nome stesso, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica per alcun prodotto proteico.
- Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni occasione una significativa perdita di informazione genetica



## **Il problema della replicazione dei terminali nei cromosomi lineari**

Riguarda solo il filamento lagging (ritardato): infatti l'ultimo primer, anche se comincia a partire dal primo nucleotide 5' dello stampo, non può essere rimpiazzato da DNA polimerasi una volta rimosso. Questa situazione si ripresenta ad ogni nuova generazione, con progressivo accorciamento del cromosoma.





# Telomere Length and Aging



- ▶ Most human somatic cells lack telomerase activity.
- ▶ Shorter telomeres are associated with cellular senescence and death.
- ▶ Diseases causing premature aging are associated with short telomeres.

# TELOMERI

## Problema:

replicazione terminale del filamento lento

-Manca l'estremità 3'OH utilizzabile per colmare il "gap" lasciato dalla rimozione dell'innesco

-Rischio catena sempre più corta ad ogni evento replicativo

Struttura delle sequenze telomeri:  
sequenze ripetute ricche in G e C nel filamento con estremità 3'

## Risoluzione:

Polimerasi specializzata in grado di aggiungere alle estremità cromosomiche blocchi ripetuti della sequenza telomerica

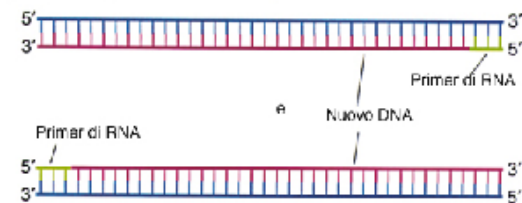
Figura 3.18

**Il problema di replicare completamente un cromosoma lineare negli eucarioti.** (a) Diagramma schematico di una molecola parentale di DNA a doppia elica rappresentante l'intera lunghezza di un cromosoma. (b) Dopo la replicazione semi-conservativa, nuovi segmenti di DNA uniti da ponti idrogeno all'elica stampo hanno primer di RNA all'estremità 5' (c) I primer di RNA sono rimossi, la DNA polimerasi riempie le interruzioni risultanti e la DNA ligasi congiunge i frammenti adiacenti. Tuttavia, ai due telomeri si trovano ancora interruzioni alle estremità 5' del nuovo DNA, derivanti dalla rimozione dei primer di RNA, perché nessuna sintesi ha potuto riempirle.

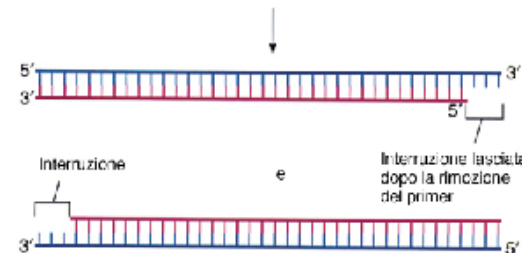
a) Cromosoma parentale con origini di replicazione multiple



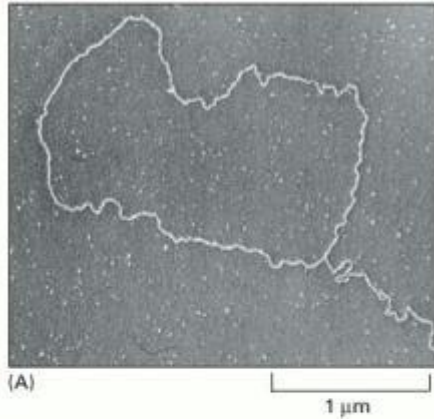
b) Dopo la replicazione



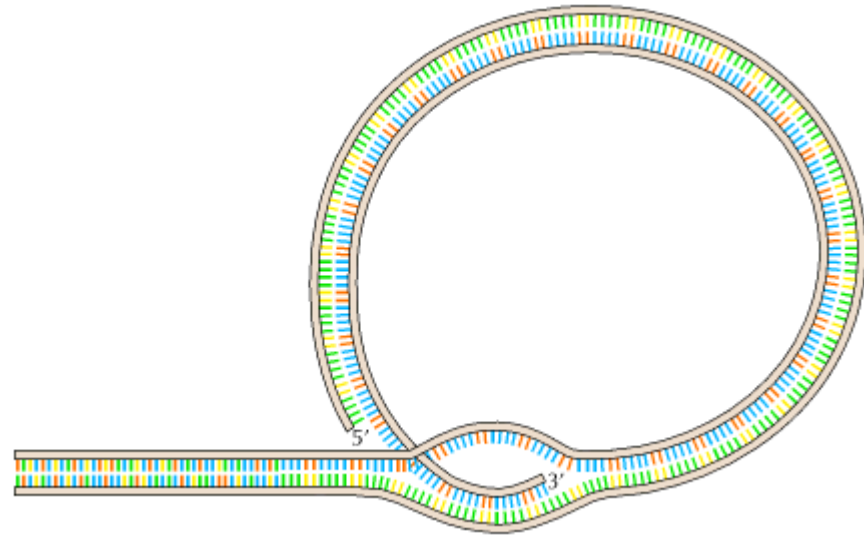
c) I primer di RNA sono rimossi, lasciando interruzioni ai telomeri







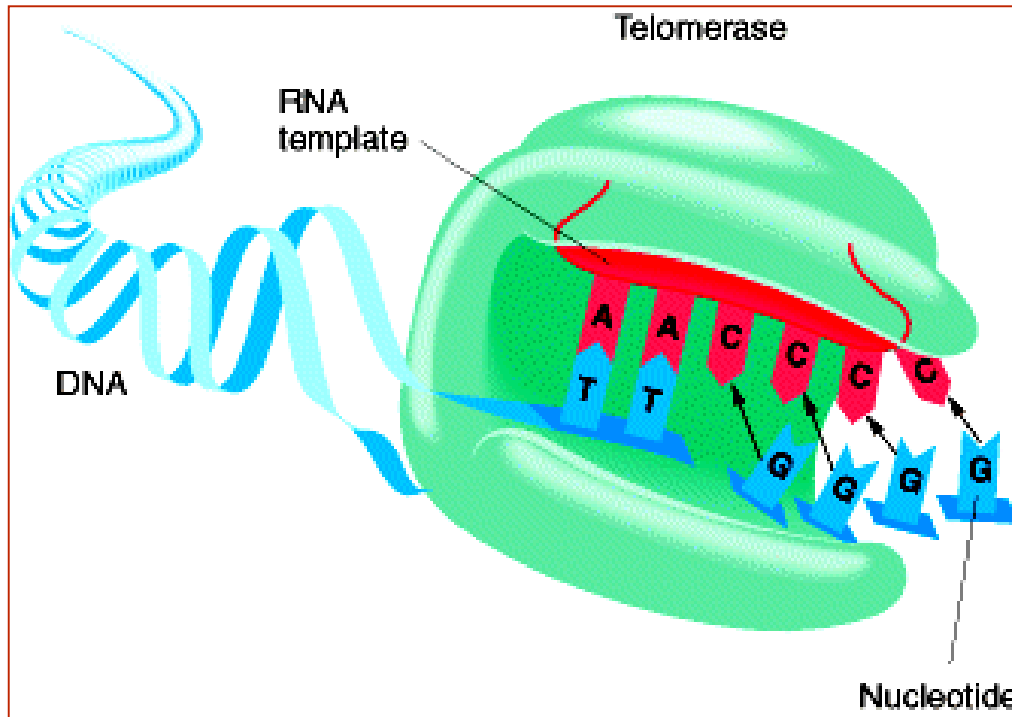
**The t-loops at the end of mammalian chromosomes.** (A) Electron micrograph of the DNA at the end of an interphase human chromosome. The chromosome was fixed, deproteinated, and artificially thickened before viewing. The loop seen here is approximately 15,000 nucleotide pairs in length.



### **Structure of a telomere**

Telomere DNA loops back on itself to form a circular structure that protects the ends of chromosomes.

## NEGLI EUCARIOTI



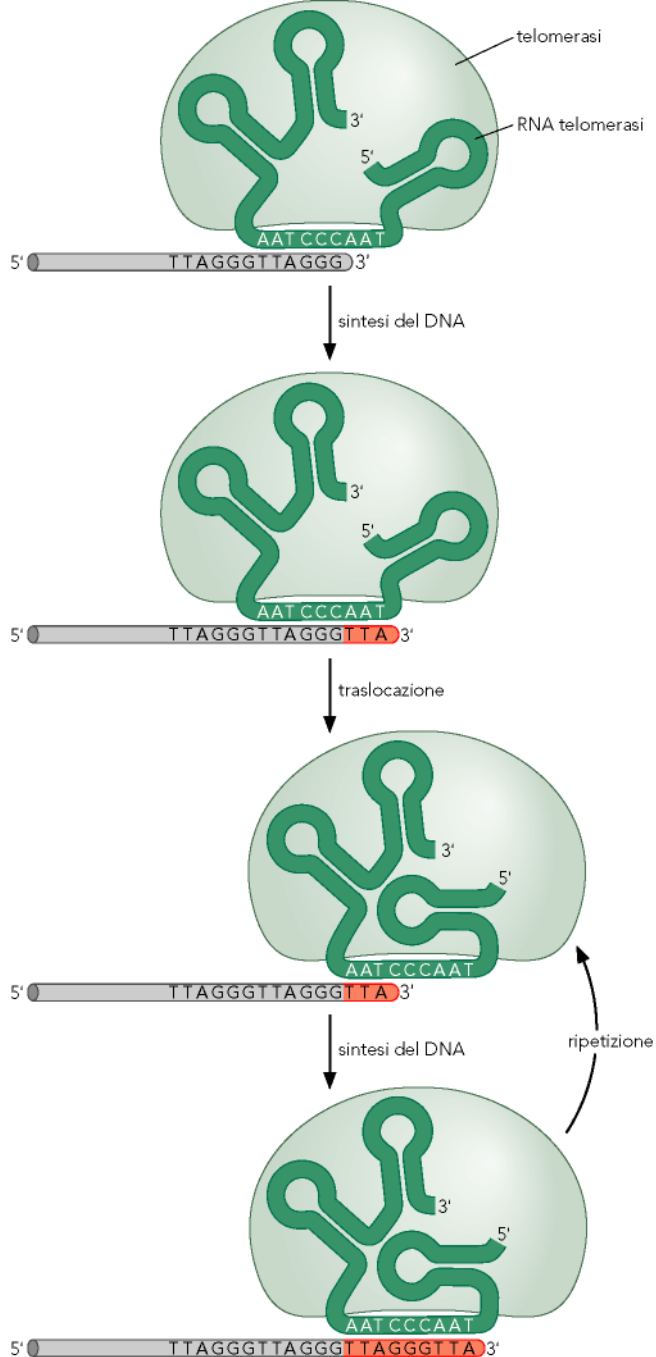
**Telomeri e telomerasi**

## **Allungamento del terminale 3' del telomero**

La telomerasi permette l'allungamento del cromosoma, in quanto il filamento 3' allungato viene usato come stampo dal normale apparato replicativo per la sintesi di ulteriori frammenti di Okazaki.

Da notare che resta comunque una porzione 3' terminale a singolo filamento. L'estensione viene regolata dal legame di proteine specifiche, che agiscono da attivatori della telomerasi quando sono poche, e da deboli inibitori quando sono molte.

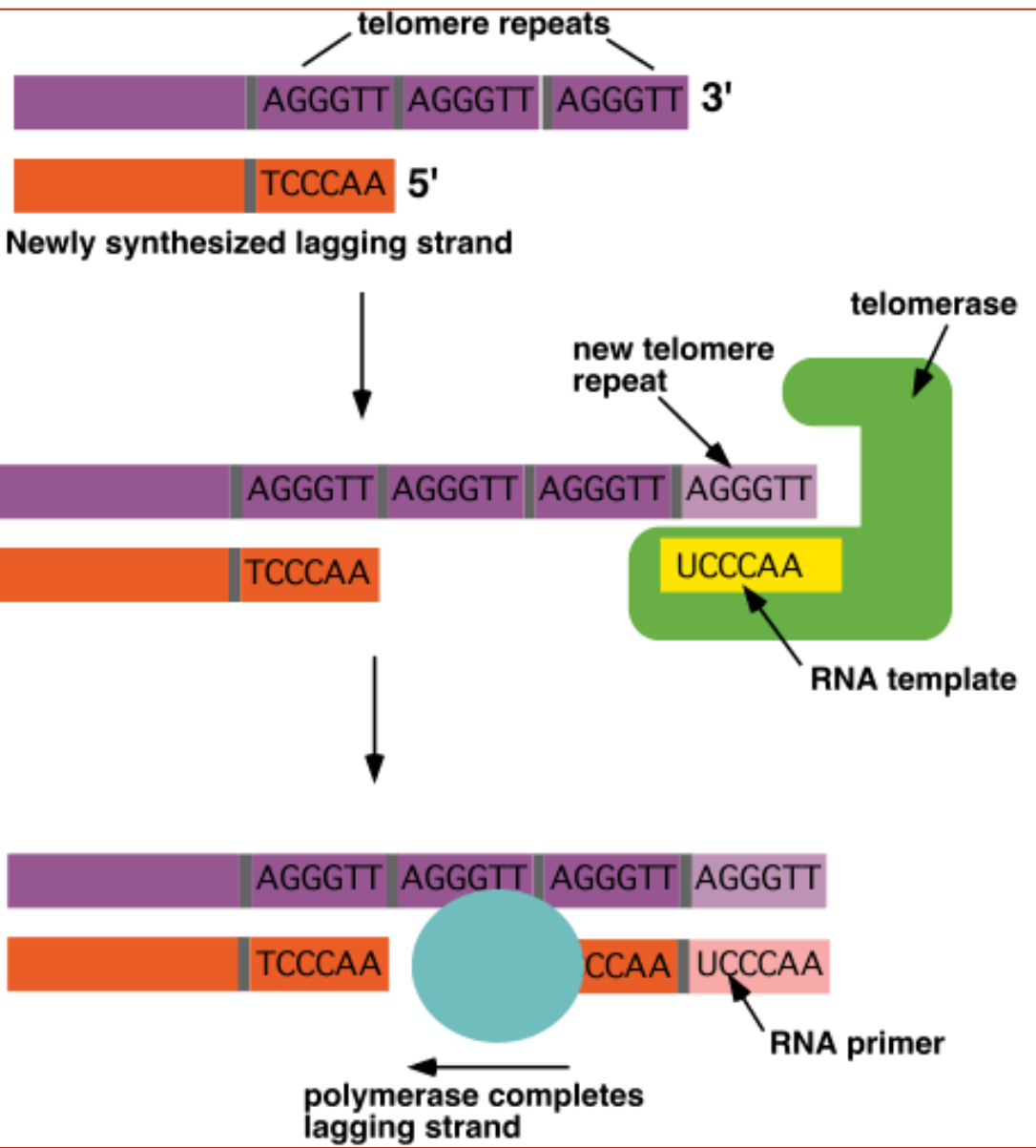
La cellula tollera una lunghezza del telomero variabile fra 200 e 400 ripetizioni.



## Replicazione dei telomeri da parte della telomerasi

Le estremità dei cromosomi eucariotici, dette telomeri, sono formate da una corta sequenza ricca in TG ripetuta molte volte, presente anche come singolo filamento al terminale 3' (nell'uomo la sequenza è 5'-TTAGGG-3'). Tale sequenza viene usata come primer da una speciale DNA polimerasi, detta telomerasi, per estendere i terminali del cromosoma. Per far ciò la telomerasi utilizza uno stampo endogeno, fornito da una molecola di RNA componente della nucleoproteina, di 9 basi: 3'-AAT-CCC-AAT-5', che può appaiarsi alla sequenza 5'-TTA-GGG-3', con formazione di un innesco stampo, che ne permette una replicazione ripetuta, grazie ad un'attività elicastica endogena. La telomerasi è di fatto una particolare trascrittasi inversa processiva.

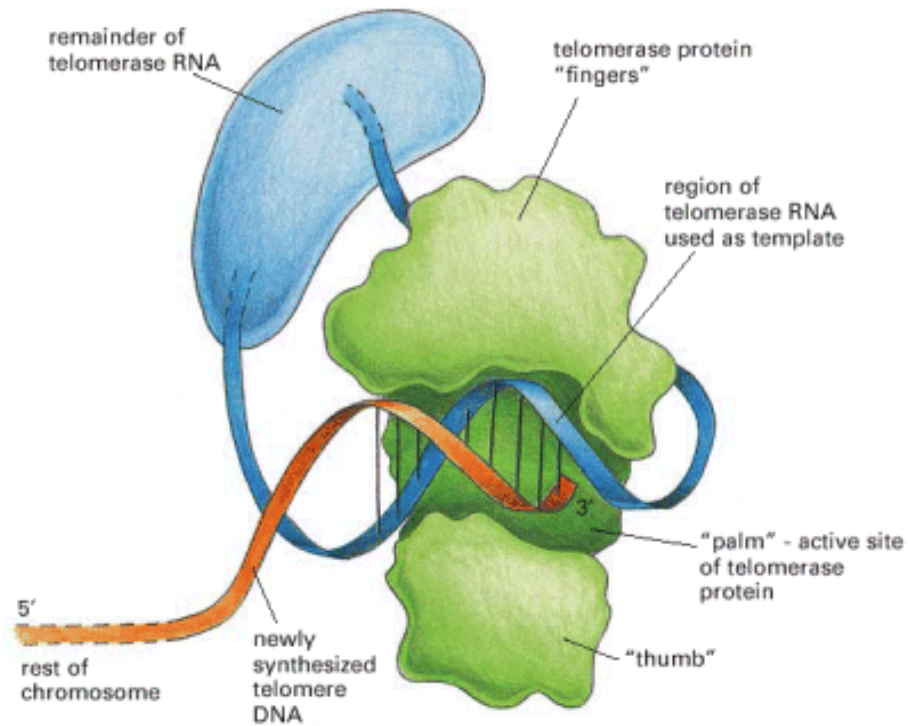




Probabilmente il meccanismo di scivolamento viene facilitato da un'attività RNA:DNA elicastica intrinseca alla Telomerasi.

La capacità della Telomerasi di effettuare cicli ripetuti è di estensione dei telomeri è un'attività regolata da proteine che si legano alle estremità telomeriche e che in base alla loro quantità (e quindi alla lunghezza dei telomeri) inibiscono l'attività telomerasica

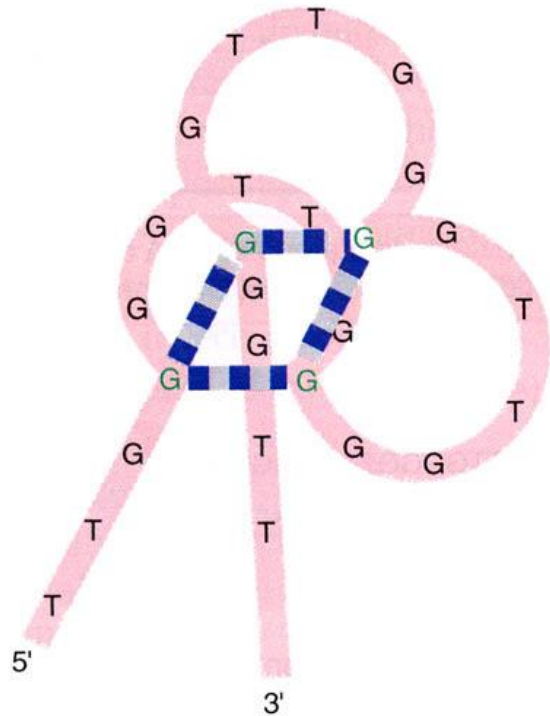
Una volta l'estremità 3'OH del telomero sia stata estesa con le normali procedure di replicazione viene sintetizzato un primer che verrà esteso dalla DNapolimerasi ed il frammento così sintetizzato (telomerico) saldato all'estremità 5'P dell'altro filamento



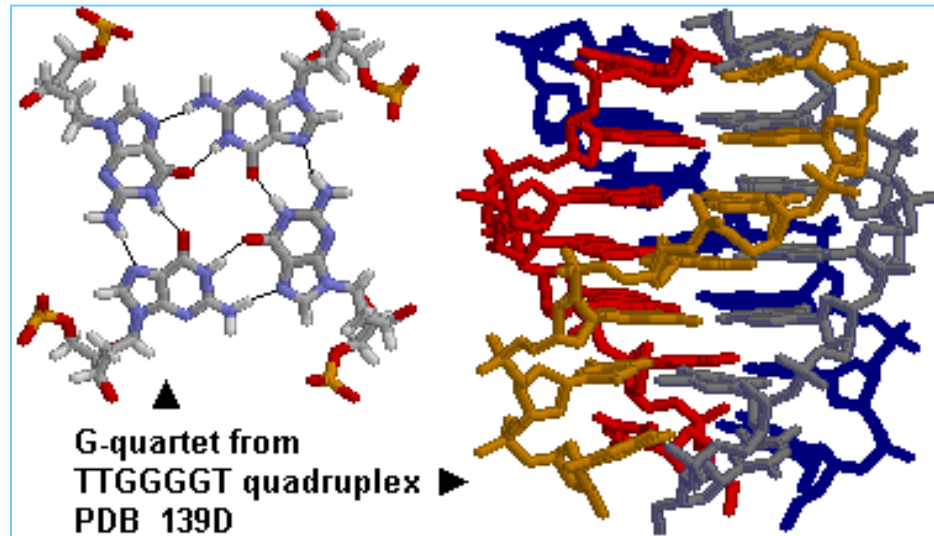
## The structure of telomerase.

The telomerase is a protein RNA complex that carries an RNA template for synthesizing a repeating, G-rich telomere DNA sequence. Only the part of the telomerase protein homologous to reverse transcriptase is shown here (*green*). A reverse transcriptase is a special form of polymerase enzyme that uses an RNA template to make a DNA strand; telomerase is unique in carrying its own RNA template with it at all times. (Modified from J. Lingner and T.R. Cech, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:226-232, 1998.)

3' AACCCC 5'      3' GGGGTT GGGG T  
 5' TTGGGG TTGGGG TTGGGGTTGGGG T



**Il comportamento insolito delle sequenze telomeriche può essere spiegato da interazioni G-G.**

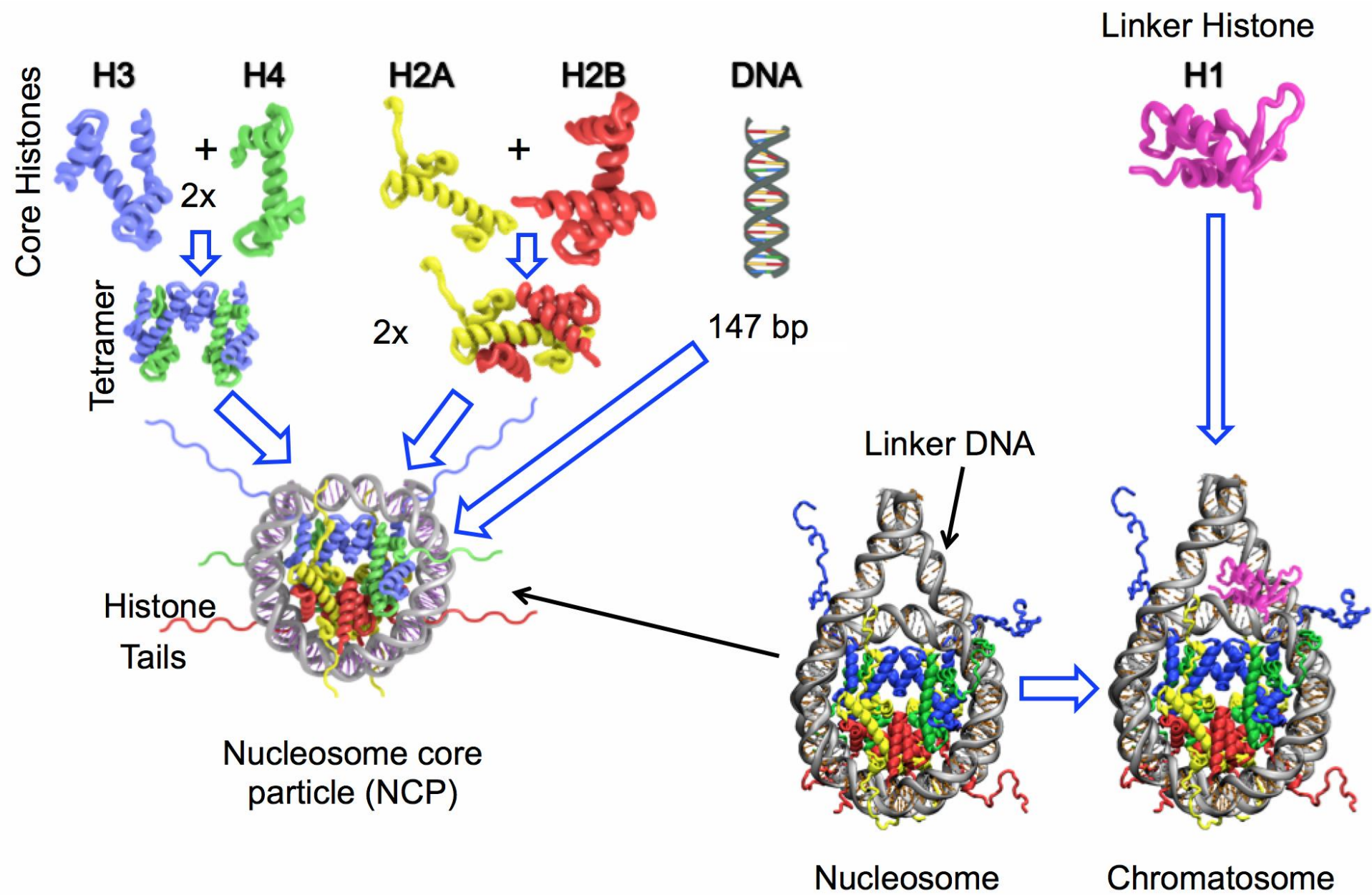


Nel modello rappresentato nella parte superiore della figura, l'appaiamento tra i residui G dà origine ad una forcina duplex.

Nel modello inferiore si forma un quartetto G quando, in una serie di quattro ripetizioni, ogni unità condivide con le altre un residuo G.

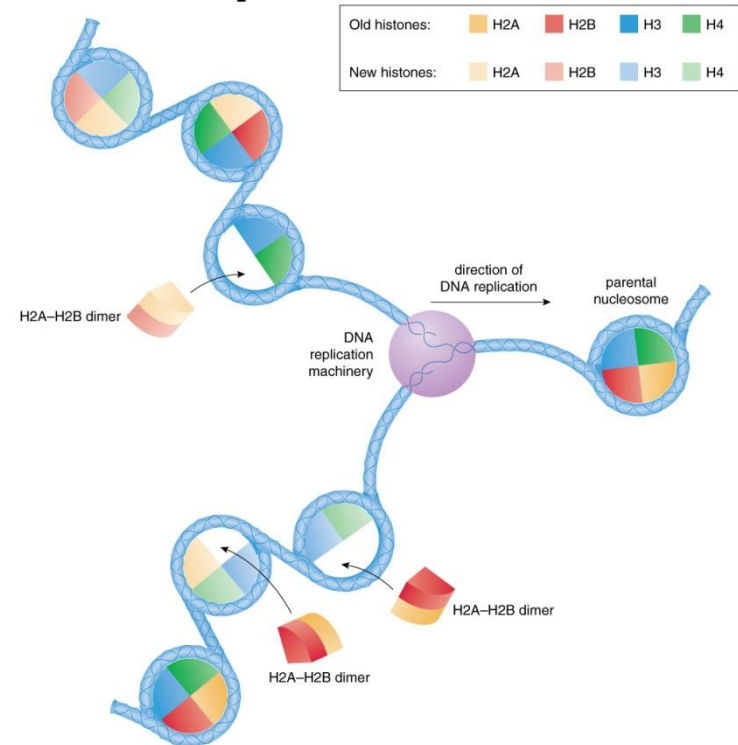
# Nucleosomes and DNA Replication

- Replication doubles the amount of DNA
  - Therefore the cell must synthesize more histones to accommodate this increase
- Synthesis of histones occurs during the S phase
  - Histones assemble into octamer structures
    - They associate with the newly made DNA very near the replication fork
- Thus following DNA replication, each daughter strand has a mixture of “old” and “new” histones
  - Refer to Figure 11.22



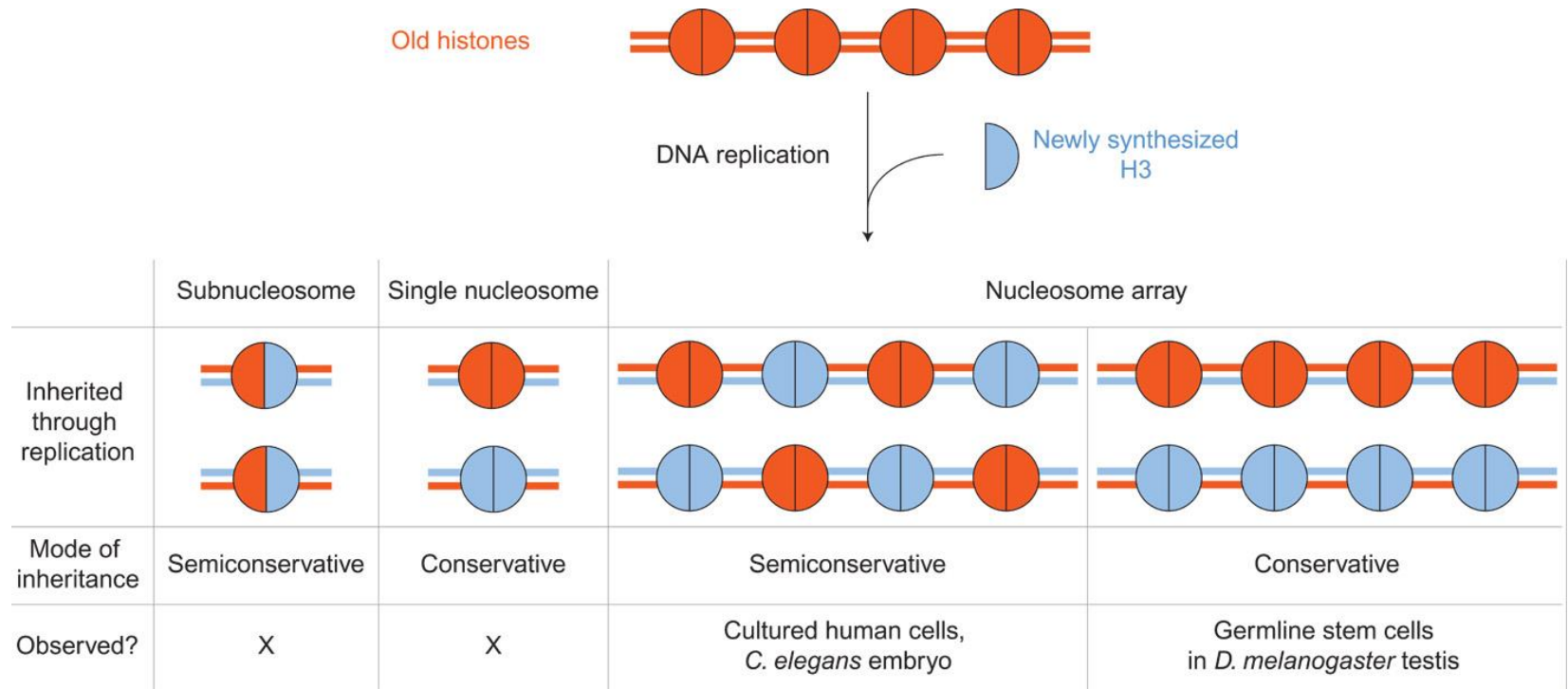
## Final Step - Assembly into Nucleosomes:

- **As DNA unwinds, nucleosomes must disassemble.**
- **Histones and the associated chromatin proteins must be duplicated by new protein synthesis.**
- **Newly replicated DNA is assembled into nucleosomes almost immediately.**
- **Histone chaperone proteins control the assembly.**





**Fig. 3 Different modes of inheritance of old H3 and newly synthesized H3 on newly replicated DNA. .**



Srinivas Ramachandran, and Steven Henikoff Sci Adv 2015;1:e1500587

## Principali differenze nella Replicazione tra Procarioti ed Eucarioti

<b>FASE</b>	<b>PROCARIOTI</b>	<b>EUCARIOTI</b>
<b>Inziatore</b>	DnaA	ORC
<b>Apertura del duplex</b>	DNA elicasi (DnaB e Dna C)	DNA elicasi
<b>Stabilizzazione del ssDNA</b>	SSB	RPA
<b>RNA primer</b>	DNA primasi	DNA pol $\alpha$ /primasi
<b>Sintesi</b>	DNA pol III	DNA pol $\delta$ per lagging e DNA pol $\epsilon$ per leader
<b>Aumento della processività</b>	Sliding clamp, clamp loader	Sliding clamp, clamp loader, fattori PCNA e RF-C
<b>Rimozione dei primer</b>	DNA pol I	RNasi H e Fen (mammiferi); RNasi H e MF1 (negli altri eucarioti); DNA pol $\delta/\epsilon$
<b>Saldatura dei nick</b>	Ligasi1	Ligasi 1
<b>Topoisomerasi</b>	I, III di tipo IV; IV e girasi tipo II	Una di tipo I, più di tipo II